

肥満・糖尿病関連因子 Angiopoietin-related growth factor (AGF) および C-peptide の生理機能の解明

著者	北澤 将史
号	41
学位授与番号	411
URL	http://hdl.handle.net/10097/36699

論文内容要旨

日本における糖尿病人口は今なお増加しており、合併症の増加とともに患者の寿命短縮や生活の質の低下、さらには医療費の高騰など社会的にも大きな問題となっている。2型糖尿病はその内の95%を占め代表的な多遺伝子疾患で、複数の遺伝素因と環境要因（生活習慣など）が重なり合って発症し、インスリン分泌の低下とインスリン抵抗性がその本態と言われ、世界中で2型糖尿病の分子治療標的となる標的分子の探索が行われている。そこで、抗肥満・抗糖尿病作用を有する事が報告されている2つのオーファンリガンドであるC-peptide、及びAngiopoietin-related growth factor (AGF)に注目し、その細胞内機能の解明を行う事を目的に、検討を行った。

C-peptideはプロインスリンからインスリンが生成される際生じるが、以前は生理活性を持たない副産物として考えられてきた。しかし、近年、糖尿病の腎症や神経症といった合併症を改善するという興味深い作用の報告がなされ、再び注目を集めるようになった。しかしながら、C-peptide特異的受容体は未だ同定されておらず、KitamuraらのSwiss3T3細胞においてC-peptideがprotein kinase C (PKC)の活性化を介しMAPキナーゼであるextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)やp38のリン酸化を引き起こすという報告があるが、生理機能発現に至る分子メカニズムはほとんど明らかにされていない。C-peptideが合併症の改善作用がある一方、炎症反応を伴った動脈硬化症を誘発するという報告があるため、本研究では、C-peptideと受容体に共役するシグナル伝達系と生体内炎症誘発物質との関連について、細胞応答が有る事が確認されているSwiss 3T3細胞を用いて検討した。はじめに、C-peptideによる誘導性の炎症性タンパク質であるcyclooxygenase-2 (COX-2)発現における影響を検討したところ、1 nM C-peptide刺激により、COX-2 mRNA及びタンパク質の発現が亢進した (Fig. 1)。また、この発現の亢進はGF109203X, Go6976及びBAY11-7082を前処置する事で阻害された事から、C-peptideによるCOX-2発現の亢進はPKC及びnuclear factor- κ B (NF- κ B)依存的なシグナル経路の活性化による事が示唆された。

発現の亢進は転写活性の上昇あるいはmRNA及びタンパク質の安定化が考えられる。そこで次に、COX-2のプロモーター領域(-328/+59)をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーターコンストラクトを作製し、C-peptideによる影響を検討した。その結果、発現解析の場合と同様に、転写活性の上昇が見られ、この転写活性の上昇は、PKC阻害剤GF109203X, Go6976及びNF- κ B阻害剤BAY11-7082を前処置する事で阻害された。COX-2のプロモーター領域には転写を制御するNF- κ B結合サイト、NF-IL6結合サイト及びcAMP response element (CRE)が存在する事、C-peptide依存的な転写活性がNF- κ B阻害剤であるBAY11-7082によりされた事から、C-peptide依存的な転写活性におけるNF- κ B結合サイトの重要性を検討するため、このサイトを含まない領域(-220/+59)のレポーターコンストラクトを作製し、

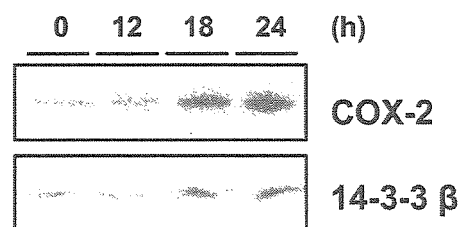


Fig. 1 C-peptideによる時間依存的なCOX-2発現誘導

C-peptide の影響を検討したところ、このコンストラクトでは転写活性の上昇は観察されなかった。これらの結果から、C-peptide による COX-2 の発現亢進は、PKC/NF- κ B 経路を介した COX-2 プロモーターの活性化によるものだという事が示唆された。次に、C-peptide の NF- κ B の活性化への影響を NF- κ B 結合配列 3 回タンデムに結合したレポーターコンストラクトを用いて検討を行った。その結果、1 nM C-peptide 刺激により、その活性は約 2 倍に増強した。NF- κ B の活性化には、定常時結合している抑制タンパク質である inhibitor- κ B (I κ B) との結合が PKC による I κ B のリン酸化により解離し、NF- κ B は核内に移行し、I κ B はその後分解される事が必要との報告がされている。そこで、さらに I κ B のリン酸化および発現量への C-peptide の影響を検討した。その結果、1 nM C-peptide 処置後 30 分で最大となる I κ B のリン酸化が見られ、さらに 60 分後には I κ B の発現量の減少が確認された。以上の結果より、C-peptide が特異的な受容体に結合することにより、PKC の活性化が生じ、その下流の I κ B を抑制することで、炎症性タンパク質の NF- κ B や COX-2 の活性化または発現を引き起こす事が示唆された。(Fig. 2)

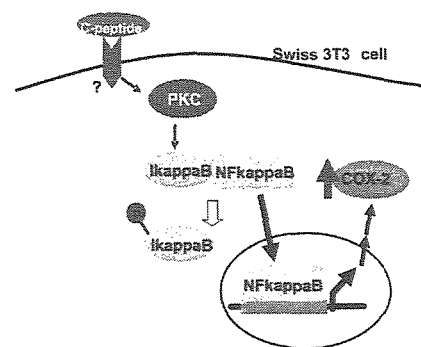


Fig. 2 C-peptide による COX-2 発現誘導に至るシグナル伝達機構

一方、AGF は、その欠損マウスにおいて、インスリン抵抗性を誘起し、肥満を呈する事が報告された事から、肥満、糖尿病に対する新しい治療分子標的になりうるものと考えられている。しかし、AGF の受容体および作用標的組織が不明であるため、AGF が何故、抗肥満および抗糖尿病作用を示すのかは明らかとなっていない。高血糖は糖尿病の主な病態であり、肝臓における糖新生の異常亢進により引き起こされている事が知られている事から、AGF による肝臓の糖新生への影響の検討を目的に、ラット肝実質細胞株である H4IIEc3 細胞を、AGF を添加した無血清培地中で 24 時間培養し、その後の糖産生量を測定した。その結果、AGF は最大約 50% まで濃度依存的に糖産生を抑制する事が明らかとなった (Fig. 3)。

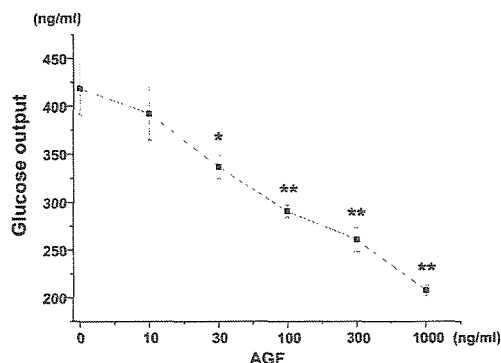


Fig. 3 AGF による H4IIEc3 細胞における糖産生作用

肝臓における糖産生は糖新生と相関する事が知られている。糖新生では多段階の反応を介し、糖が作られる。その糖新生の律速酵素として知られている glucose-6-phosphatase (G6Pase) および phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) は、糖尿病患者で発現が上昇し、その上昇が病因と深く結びついている事が知られている。そこで、AGF 処置による、それらの遺伝子およびタンパク質発現レベルの変化を測定したところ、PEPCK は遺伝子、タンパク質発現共に変化しなかった一方、G6Pase の遺伝子発現は最大約 50% の抑制を示し、タンパク質も同様に減少している事が明らかとなった。これらの抑制は株化細胞だけでなく、ラットの肝臓から単離した初代肝実質細胞でも観察された事から、AGF

は肝臓を標的組織とし、糖新生抑制作用を有する事が示唆された。

次に、AGF による糖産生抑制の作用メカニズムの検討をおこなった。薬物刺激後、短時間でシグナルの増強あるいは抑制因子の遺伝子発現変化が誘導される事が報告されていることから、AGF 刺激後 3 時間における遺伝子発現変動を、Gene Chip を用いて解析を行ったところ、シグナル分子の中で、Akt と高いホモロジー（アミノ酸配列 54% 相同）を持ち、一部同様の基質のリン酸化を制御するキナーゼの serum- and glucocorticoid-regulated kinase (SGK) 及び Akt に直接結合し、その活性を抑制する Trib3 が最も増強されていた。すなわち、AGF 刺激によって Akt を中心としたシグナルに関連する遺伝子の発現が増強されていた。これらの結果から、AGF は Akt シグナルを活性化することを予想し、3 種の Akt の阻害剤を用いて、Akt の AGF による糖新生抑制作用への関与を検討した。その結果、それら全ての阻害剤は AGF による糖新生抑制作用を抑制した。また、ウェスタンブロット法を用いて、AGF が実際に Akt の活性化を引き起こすかを検討したところ、濃度依存的に Akt 及びその基質である forkhead box class O1 (Foxo1), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) のリン酸化を引き起こす事が明らかとなった。Foxo1, GSK3 β が、Akt のリン酸化に遅れてリン酸化を引き起こしている事からも、それらは Akt によってリン酸化されている事が示唆された。(Fig. 4)

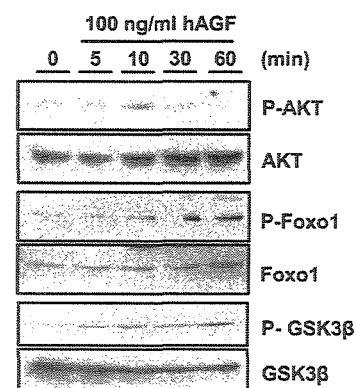


Fig. 4 AGF による Akt、その基質 FoxO1 及び GSK のリン酸化

Foxo1 は G6Pase の発現を正に制御する転写因子で、通常、核内で G6Pase の転写制御エレメントの IRE に結合しているが、リン酸化される事により、核から細胞質へ移行し、そこで分解される。その結果として、G6Pase の発現は低下する事で糖新生が抑制されることが知られている。そのため、AGF による Foxo1 の細胞内局在への影響を検討した。AGF 刺激後の細胞抽出液を細胞質、核に分画したところ、Foxo1 は細胞質に移行している事が明らかとなった。この核外への移行は免疫染色によっても確認する事が出来た事から、AGF は Foxo1 の核移行を誘導し、糖新生を抑制する事が示唆された。以上の結果から、AGF は PI3K/Akt 経路の活性化を誘導する事により、転写因子 FoxO1 の核外移行を促進し、転写活性の抑制による G6Pase の発現抑制により、糖産生抑制作用を有している事が、示唆された (Fig. 5)。

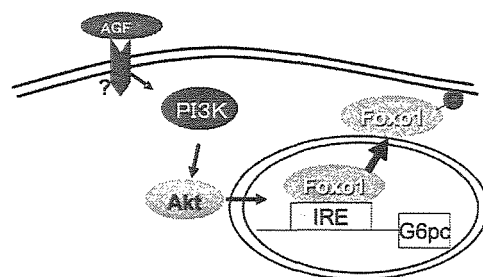


Fig. 5 AGF による糖新生抑制作用に至るシグナル伝達機構

本研究により、AGF 及び C-peptide の抗肥満・抗糖尿病作用の標的組織のひとつを示し、その細胞内作用機構の解明をする事に成功した。この知見を基に、受容体の同定、さらには AGF 及び C-peptide を標的とした糖尿病治療薬の創製に活用できるものと期待している。

審査結果の要旨

日本における糖尿病患者は増加している。2型糖尿病はその内の95%を占め代表的な多遺伝子疾患で、複数の遺伝素因と環境要因が重なり合って発症するもので、世界中で2型糖尿病の分子治療標的となる標的分子の探索が行われている。本研究では、抗肥満・抗糖尿病作用を有することが報告されている2つのオーファンリガンドであるC-peptide、及びAngiopoietin-related growth factor (AGF)の細胞内機能を精査し、標的分子としての可能性を検討した。

C-peptideはプロインスリンからインスリンが生成される際生じるが、近年、C-peptideが合併症の改善作用がある一方、炎症反応を伴った動脈硬化症を誘発するという報告がなされ、C-peptideの細胞内機能を明らかとするため、C-peptideに応答することが知られるSwiss 3T3細胞を用いて検討した。

まず、C-peptideにより誘導性の炎症性タンパク質であるCOX-2 mRNA及びタンパク質の発現が亢進され、この亢進はPKC及びNF- κ B依存的なシグナル経路の活性化によることを示した。

次に、COX-2のプロモーター領域(-328/+59)をルシフェラーゼ遺伝子に結合したレポーターコンストラクトを用いた解析から、COX-2発現上昇は、PKC/NF- κ B経路を介したCOX-2プロモーターの活性化であることを示した。

さらにI κ Bのリン酸化および発現量へのC-peptideの影響を検討した。その結果、C-peptideが特異的な受容体に結合することにより、PKCの活性化が生じ、その下流のI κ Bを抑制することで、炎症性タンパク質のNF- κ BやCOX-2の活性化または発現を引き起こすことを示した。

一方、Angiopoietin-related growth factor (AGF)は、その欠損マウスにおいて、インスリン抵抗性を誘起し、肥満を呈することが報告されたことから、肥満、糖尿病に対する新しい治療分子標的になりうるものと考えられている。しかし、AGFの受容体および作用標的組織が不明であるため、治療標的として用いるには詳細な作用機構の解明が必要である。

高血糖は糖尿病の主な病態であり、肝臓における糖新生の異常亢進により引き起こされていることが知られていることから、AGFによる肝臓の糖新生への影響の検討を目的に、ラット肝実質細胞株であるH4IIEc3細胞を、AGFを添加した無血清培地中で24時間培養し、その後の糖産生量を測定した。その結果、AGFは最大約50%まで濃度依存的に糖産生を抑制することを明らかとした。

肝臓における糖産生は糖新生と相関することが知られている。糖新生では多段階の反応を介し、糖が作られる。その糖新生の律速酵素として知られているG6PaseおよびPEPCKは、糖尿病患者で発現が上昇し、その上昇が病因と深く結びついていることが知られている。そこで、AGF処置による、それらの遺伝子およびタンパク質発現レベルの変化を測定したところ、PEPCKは遺伝子、タンパク質発現共に変化しないが、G6Paseの遺伝子発現は最大約50%の抑制を示し、タンパク質も同様に減少していることを明らかとした。これらの抑制は株化細胞だけでなく、ラットの肝臓から単離した初代肝実質細胞でも観察されたことから、AGFは肝臓を標的組織とし、糖新生抑制作用を有することを示唆した。

以上の如く、本研究はC-peptide及びAngiopoietin-related growth factor (AGF)の細胞内機能の詳細が

明らかとなり，今後の抗糖尿病薬開発に有益な新規知見を与えたものである。

よって，本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。